PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

A61K 49/00

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/47538

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE98/01001

(22) Internationales Anmeldedatum:

2. April 1998 (02.04.98)

(4.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 17 904.5

23. April 1997 (23.04.97)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LICHA, Kai [DE/DE];
 Argentinische Allee 179, D-14169 Berlin (DE). RIEFKE,
 Björn [DE/DE]; Weverstrasse 51, D-13595 Berlin
 (DE). SEMMLER, Wolfhard [DE/DE]; Jahnstrasse 17,
 D-13467 Berlin (DE). WRASIDLO, Wolfgang [DE/DE];
 Knausstrasse 14, D-14193 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

- (54) Title: ACID-LABILE AND ENZYMATICALLY DIVISIBLE DYE COMPOUNDS FOR DIAGNOSIS WITH NEAR INFRARED LIGHT AND FOR THERAPY
- (54) Bezeichnung: SÄURELABILE UND ENZYMATISCH SPALTBARE FARBSTOFFKONSTRUKTE ZUR DIAGNOSTIK MIT NAHINFRAROTLICHT UND ZUR THERAPIE

(57) Abstract

The invention relates to acid-labile and enzymatically divisible compounds for in-vivo and in-vitro diagnosis by means of near infrared radiation (NIR-radiation), the use of said compounds as optic diagnostic and therapeutic agents, and the diagnostic agents containing said compounds.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft säurelabile und enzymatisch spaltbare Verbindungen zur In-vivo- und In-vitro-Diagnostik mittels Nahin-frarot-Strahlung (NIR-Strahlung), die Verwendung dieser Verbindungen als optische Diagnostika und Therapeutika und diese Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
ВJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	υG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

"Säurelabile und enzymatisch spaltbare Farbstoffkonstrukte zur Diagnostik mit Nahinfrarotlicht und zur Therapie"

5 .

ŧ

Beschreibung

Die Erfindung betrifft säurelabile und enzymatisch spaltbare Verbindungen zur In-vivo- und In-vitro
Diagnostik mittels Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung), die Verwendung dieser Verbindungen als optische Diagnostika und Therapeutika und diese Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel.

- 15 Die Nahinfrarotbildgebung ist ein nicht invasives diagnostisches Verfahren, bei dem die hohe Durchlässigkeit biologischen Gewebes für Licht der Wellenlänge 650-1000 nm ausgenutzt wird. Im Gegensatz zu Licht des ultravioletten und sichtbaren Spektralbereichs, 20 das nur in die obersten Millimeter des Gewebes eindringen kann, werden bei Verwendung von Nahinfrarotlicht Eindringtiefen in Gewebe von bis zu mehreren Zentimetern erzielt. Die Ursachen für die prinzipiell geringe Eindringtiefe von Licht sind die Absorption körpereigener 25 Farbstoffe, hauptsächlich des Hämoglobins und des Wassers, die jedoch im Spektralbereich des Nahinfrarotlichtes zwischen 650 und 1000 nm minimale Werte aufweisen. Dieser spektrale Bereich der größten optischen Gewebetransparenz wird daher auch diagnostisches/therapeutisches Fenster genannt (Boulnois, 30 J., Lasers Med Sci 1986, 1:47-66).
- diagnostisches/therapeutisches Fenster genannt (Boulnois, J., Lasers Med Sci 1986, 1:47-66).
 Dem Diagnostiker steht hiermit neben den modernen bildgebenden Verfahren, wie Röntgen, Magnetresonanz-tomographie oder Ultraschalldiagnostik, ein weiteres
 Verfahren zur bildlichen Gewebedarstellung zur Verfügung (Haller, E.B., Time-resolved transillumination and optical tomography. J Biomed Optics 1996, 1:7-17).

Die Verwendung von NIR-Strahlung zur ortsabhängigen Aufzeichnung von Blutfluß und Oxygenierungsgrad im Gehirn von Säuglingen durch die Detektion der Absorption von Hämoglobin/Deoxyhämoglobin ist ein seit Jahren bekanntes und angewandtes Verfahren (Jöbsis, F.F., Science 1977, 198:1264-67; Chance, B., Leigh, J.S., Miyake, H. et al., Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85:4971-75; Benaron D.A. et al., Science 1993, 33: 369A.).

2

Das wesentliche Problem bei der Nutzung von nahinfraroter Strahlung ist die starke Streuung des Lichtes, so daß selbst bei unterschiedlichen photophysikalischen Eigenschaften von einem scharf begrenzten Objekt und seiner Umgebung sich dieses Objekt nur unscharf abzeichnet. Das Problem nimmt mit wachsender Entfernung des Objektes von der Oberfläche zu und kann als hauptsächlicher limitierender Faktor sowohl bei der Transillumination als auch bei der Detektion von Fluoreszenzstrahlung angesehen wer-

den. Deshalb können Farbstoffe als Kontrastmittel, die

- die optischen Eigenschaften der Gewebe prägen und zu einer erhöhten Absorption und Fluoreszenz der zu detektierenden Gewebe führen, auch bei geringer Ortsauflösung eine eindeutige Detektion ermöglichen. Dabei kann das Absorptionsverhalten solcher
- Farbstoffverbindungen als bildgebende Information ausgenutzt werden. Besitzen die Farbstoffe darüberhinaus die Eigenschaft, die absorbierte Energie als Fluoreszenzstrahlung zu emittieren, so kann diese ebenfalls als bildgebende Information genutzt werden.
- Hierbei wird die gegenüber der Anregungsstrahlung rotverschobene Fluoreszenzstrahlung gesondert detektiert. Der Vorteil besteht u. a. darin, daß das Gewebe selbst im NIR-Bereich eine äußerst geringe Eigenfluoreszenz aufweist und somit der Untergrund minimal ist.

(S. Folli et al., Cancer Research 54, 2643-9 (1994); B. Ballou et al., Cancer Immunol. Immunother. 41, 257-63 (1995); X. Li et al., SPIE Vol. 2389, 789-98 (1995)).

3

- In der Fluoreszenzdiagnostik ist die Voraussetzung dafür eine ausreichende, möglichst hohe Differenz in der Fluoreszenzemission zwischen zu detektierendem und umliegendem Gewebe. Dies kann prinzipiell durch eine Differenz in der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Substanzapplikation erreicht werden. Insbesondere für die Diagnostik in tieferen Gewebeschichten ist diese Differenz bei der Verwendung von Substanzen mit unspezifischem Anreicherungsverhalten oft nicht ausreichend.
- Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, neue Verbindungen zur Verfügung zu stellen, welche die Nachteile des Standes der Technik überwinden.
- Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

 $(F-L)_m-A$ (I)

25 gelöst, worin

15

- F für ein Farbstoffmolekül mit mindestens einem Absorptionsmaximum zwischen 600 und 1200 nm steht,
- 30 L für eine Linkerstruktur, welche eine säurelabile und/oder enzymatisch spaltbare Bindung enthält, steht,
 - m eine Zahl zwischen 1 und 80 ist,

wobei für den Fall, daß m eine Zahl zwischen 1 und 3 ist,

4

- A ein Farbstoffmolekül mit mindestens einem
 Absorptionsmaximum zwischen 600 und 1200 nm, ein
 antibiotisch oder antizytostatisch wirksames
 Molekül, ein Biomolekül, ein nicht biologisches
 Makromolekül oder eine Verbindung B-(L-W), oder
 D-(L-W), darstellt, wobei
- 10 D ein nicht biologisches Makromolekül ist,
 - B ein Biomolekül ist,

25

- L die oben genannte Bedeutung hat,
- W ein antibiotisch oder antizytostatisch wirksames Molekül darstellt,
- 15 o eine Zahl zwischen 1 und 20 ist,

und wobei für den Fall, daß m eine Zahl zwischen 4 und 80 ist,

- 20 A ein Biomolekül, ein nicht biologisches Makromolekül oder eine Verbindung B-(L-W), oder D-(L-W), darstellt, wobei
 - D, B, L, W und o die oben genannten Bedeutungen haben.

Die besondere Eigenschaft hinsichtlich der In-vivoDetektion der nahinfraroten Fluoreszenzemission der
erfindungsgemäßen Verbindungen besteht darin, daß diese
eine geringe bis gar keine Fluoreszenzemission aufweisen
und erst nach Spaltung dieses Konstruktes bzw. Abspaltung
des Farbstoffes vom Konstrukt am Zielort (z. B. Tumor,
Entzündungen) eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals
auftritt. Die effektive Differenz des Fluoreszenzsignals
zwischen zu detektierendem und umliegenden Gewebe wird
demzufolge durch

a) die Konzentrationsdifferenz aufgrund pharmakokinetischer Mechanismen und

b) durch die Differenz in der Fluoreszenzquantenausbeute zum Zeitpunkt der Diagnostik

5

5 geprägt.

Es wurde gefunden, daß die Fluoreszenz der Farbstoffe gequencht wird, wenn ein Farbstoffmolekül an ein weiteres Molekül (Dimere) unter Erhalt der erfindungsgemäßen Verbindungen gekoppelt ist, d. h. es tritt eine äußerst 10 geringe Fluoreszenzemission im Vergleich zum entsprechenden Farbstoffmolekül im ungebundenen Zustand auf. Es wurde darüberhinaus gefunden, daß ein vergleichbares Quenching auftritt, wenn andere Moleküle mit aromatischen Strukturen, welche sowohl Farbstoffe als 15 auch Wirkstoffe (z. B. Zytostatika oder Antibiotika) sein können, mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Überraschenderweise tritt ebenso ein Quenching bei Kopplung der Farbstoffe an Antikörper, 20 Antikörperfragmente und Proteine auf.

Grundsätzlich müssen sich die Farbstoffe, die struktureller Bestandteil der erfindungsgemäßen Verbindungen sind, in ihrer monomeren unkonjugierten Form durch hohe molare Absorptionskoeffizienten und hohe Fluoreszenzquantenausbeuten auszeichnen.

30

25

Bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel I zeichnen sich dadurch aus, daß F und/oder A für einen

Polymethinfarbstoff, Tetrapyrrolfarbstoff, Tetraazapyrrolfarbstoff, Xanthinfarbstoff, Phenoxazinfarbstoff oder Phenothiazinfarbstoff stehen.

Besonders bevorzugt sind die Strukturen aus der Klasse der Polymethinfarbstoffe, da diese Absorptionsmaxima mit sehr hohen molaren Absorptionskoeffizienten im nahinfraroten Spektralbereich zwischen 700 und 1000 nm aufweisen (ɛ bis zu 300000 l mol⁻¹ cm⁻¹), wie beispielsweise Cyaninfarbstoffe, Squariliumfarbstoffe und Croconiumfarbstoffe, sowie Merocyanin- und Oxonolfarbstoffe.

Ferner sind solche erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) bevorzugt, bei denen F und/oder A für einen

25 Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel II

$$R^{2}$$
 R^{3}
 R^{4}
 $CH=Q-CH=$
 R^{6}
 R^{6}
 R^{6}
 R^{10}
 R^{10}
 R^{10}
 R^{10}
 R^{10}
 R^{10}
 R^{10}
 R^{10}

30 stehen, worin

10

PCT/DE98/01001

 R^1 bis R^4 und R^7 bis R^{10} unabhängig voneinander für ein Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatom oder eine Nitrogruppe oder für einen Rest -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹, -E¹,

5 -E

10

15

20

25

wobei E¹ und E² unabhängig voneinander für ein Wasserstofiatom, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C₁-C₅₀-Alkylkette, wobei die Kette oder Teile dieser Kette gegenbenenfalls eine oder mehrere aromatische oder gesättigte zyklische C₅-C₆- oder bizyklische C₁₀-Einheiten formen können, steht, und wobei die C₁-C₅₀-Alkylkette von 0 bis 15 Sauerstoffatomen und/oder von 0 bis 3 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen, 0 bis 5 Estergruppen, 0 bis 3 Carbongruppen, 0 bis 3 Aminogruppen, substituiert ist,

und wobei jeweils benachbarte Reste R₁ - R₄ und/oder R₇ - R₁₀ unter Bildung eines sechsgliedrigen aromatischen Kohlenstoffringes miteinander verknüpft sein können,

 R^5 und R^6 unabhängig voneinander für einen Rest -E¹ mit der oben angegebenen Bedeutung oder für eine C₁-C₄-Sulfoalkylkette stehen,

und/oder R^1 bis R^{10} für eine Verknüpfung mit L stehen,

Q ein Fragment

WO 98/47538

5

10

3

ist,

OR¹²

worin

R¹¹ für ein Wasserstoff-, Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatom oder eine Nitrogruppe oder einen Rest -NE¹E², -OE¹ oder -E¹, wobei E¹ und E² die oben angegebene Bedeutung haben oder für eine Verknüpfung mit L steht,

 ${\tt R}^{12}$ für ein Wasserstoffatom oder einen Rest ${\tt E}^1$ mit der oben angegebenen Bedeutung steht,

b eine Zahl 0, 2 oder 3 bedeutet,

15 X und Y unabhängig voneinander O, S, -CH=CH- oder ein

Fragment CH₂R¹³

20 darstellt, worin

R¹³ und R¹⁴ unabhängig voneinander für Wasserstoff, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C₁ - C₁₀-Alkylkette, die durch bis zu 5 Sauerstoffatome unterbrochen und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert

WO 98/47538

15

20

25

9

sein kann, stehen, und wobei die Reste R^{13} und R^{14} unter Ausbildung eines 5- oder 6-gliedrigen Ringes miteinander verknüpft sein können.

PCT/DE98/01001

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I), in denen Farbstoffe mit einem therapeutisch wirksamen Molekül über eine physiologisch spaltbare Bindung verknüpft sind, oder Farbstoff und Wirkstoff über physiologisch spaltbare Bindungen an Biomoleküle oder nicht biologische Trägermoleküle gekoppelt sind.

Besonders bevorzugt sind Konstrukte, bei denen die Fluoreszenz des Farbstoffes im gekoppelten Zustand gequencht und die therapeutische Aktivität des Wirkmoleküls durch die Kopplung an Farbstoff bzw. Trägermolekül maskiert ist (Pro-Drug-Effekt). Die Spaltung der Bindung führt zu einer Erhöhung der Fluoreszenzemission bei gleichzeitiger Freisetzung der Aktivität des Wirkstoffes.

Wirkstoffe W und/oder A in der erfindungsgemäßen allgemeinen Formel (I) sind beispielsweise die im folgenden aufgeführten Verbindungen:

Antibiotika: Aclacinomycin, Actinomycin F₁, Anthramycin, Azaserin, Bleomycine, Cactinomycin, Carubicin, Carzinophilin, Chromomycine, Dactinomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin, Mtiomycine, Mycophenolsäure,

Nogalamycin, Olivomycine, Peplomycin, Plicamycin, Porfiromycin, Puromycin, Streptonigrin, Tubercidin, Zorubicin,

Folsäure-Analoga: Denopterin, Metothrexat, Pteropterin, Trimetrexat,

Pyrimidin-Analoga: Ancitabin, Azacitidin, 6-Azauridin, Carmofur, Cytarabin, Doxifluridin, Enocitabin, Floxuridin, 5-Fluor-Uracil,

Purin-Analoga: Fludarabin, 6-Mercaptopurin, Thiamiprin,

Thioguanin und Derivate der genannten Verbindungen, alkylierende Substanzen: Alkylsulfonate, Aziridine, Ethylenimine, Methylmelamine, Nitroharnstoffe, Stickstofflostverbindungen,

hormonell wirksame Substanzen wie Androgene,

- Antiadrenale, Antiandrogene, Antiestrogene, Estrogene,
 LH-RH-Analoga und Progestogene,
 sowie weitere zytostatisch wirksame Substanzen, wie Taxol
 und Taxol-Derivate.
- Weitere Wirkstoffe sind photodynamisch aktive Substanzen, die sich durch das Vermögen auszeichnen, nach Anregung eine photosensibilisierende Wirkung durch Bildung zytotoxischen Singulettsauerstoffs und von Radikalen entfalten. Solche Verbindungen sind in erster Linie
- Tetrapyrrole bzw. Tetraazapyrrole, bespielsweise Porphyrine, Benzoporphyrine, Chlorine, Purpurine, Phthalocyanine, Naphthalocyanine und Derivate der genannten Verbindungen. Weitere Verbindungen sind expandierte Porphyrine, Porphycene und Oxazin-bzw.
- 25 Phenoxazinfarbstoffe.

Die chemische Bindung, die gemäß der allgemeinen Formel
(I) in der Linkerstruktur L enthalten ist, ist
strukturell derart beschaffen, daß diese bei bestimmten
physiologischen Parametern, durch die erkrankte Gewebe
(Tumoren) charakterisiert sind und welche sich von
normalen Gewebebereichen unterscheiden, gespalten wird.

Es ist in der Literatur beschrieben, daß Tumore durch geringere pH-Werte im Vergleich zu Normalgewebe charakterisiert sind. Während der intrazelluläre pH-Wert

weitgehend identisch ist (ca. pH 7.4) ist der extrazelluläre pH-Wert in Tumoren um bis zu 0.5 pH-Einheiten erniedrigt. Auch Entzündungen, insbesondere bakterieller Art, sind durch erniedrigte pH-Werte

11

- gekennzeichnet. Die Methoden zur Bestimmung der pH-Werte 5 sind u. a. Messungen mit Mikroelektroden, Fluoreszenzmessungen mit pH-sensitiven Fluoreszenzproben und Messungen mit MR-Sonden (R. J. Gillies et al., Am. J. Physiol. 267,pC 195-203 (1994),
- G. R. Martin und R. K. Jain, Microvascular Research 46, 10 216-230 (1993),
 - L. E. Gerweck und K. Seetharaman, Cancer Research 56, 1194-1198 (1996)),
 - K. Engin et al., Int. J. Hyperthermia 11(1995) 211-216,
- K. Engin et al., Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 15 29 (1994) 125-132,
 - G. Helmlinger et al., Nature Medicine 3 (1997) 177-182.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher Verbindungen mit Linkerstrukturen L, die durch erniedrigte 20 physiologische pH-Werte gespalten werden. Solche Strukturen sind beispielsweise Alkylhydrazone, Acylhydrazone, Arylhydrazone, Sulfonylhydrazone, Imine, Oxime, Acetale, Ketale, Orthoester entsprechend den 25 Fragmenten

12

worin p für eine Zahl zwischen 2 und 4 steht.

Die Spaltung der erfindungsgemäßen Verbindungen kann neben der Spaltung aufgrund erniedrigter pH-Werte auch durch Enzyme, die in den zu detektierenden Geweben (z.B. Tumoren, bakterielle Entzündungen) in erhöhter Konzentration vorliegen, erfolgen.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher Verbindungen mit Linkerstrukturen L, die enzymatisch gespalten werden. Enzymatisch spaltbare Linkerstrukturen sind beispielsweise solche, die durch Kathepsine, Peptidasen, Carboxypeptidasen, α - und β -Glukosidasen, Lipasen,

Carboxypeptidasen, α- und β-Glukosidasen, Lipasen,
Oxidasen, Phospholipasen, Phosphatasen,
Phosphodiesterasen, Proteasen, Elastasen, Sulfatasen,
Reduktasen, Transferasen und bakterielle Enzyme,
beispielsweise Penicillin-Amidasen sowie β-Lactamasen,
gespalten werden (P. D. Senter et al., Bioconjugate
Chem. 6 (1995), 389-94).

Bevorzugte enzymatisch spaltbare Strukturen sind kurzkettige Peptidsequenzen, wie beispielsweise Sequenzen, die die Aminosäuresequenz Val-Leu-Lys enthalten.

25

Die Kinetik, die zu einer Anreicherung im zu detektierenden Gewebe bzw. zu einem entsprechenden Konzentrationsgradienten zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Applikation führt, muß sowohl mit der Kinetik der

Spaltung der erfindungsgemäßen Verbindungen als auch der Kinetik des Abtransportes des freigesetzten Farbstoff-moleküls korrelieren und zu einem synergistischen Effekt führen.

13

5

10

15

20

Weitere bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel (I) zeichnen sich dadurch aus, daß A und/oder B für einen Antikörper, deren Konjugate und Fragmente, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, natürliche oder synthetische Ribonukleinsäuren oder Desoxyribonukleinsäuren oder deren chemische Modifikationen, wie Aptamere oder Antisenseoligonukleotide, Lipoproteine, Lectine, Kohlenhydrate, Mono-, Di- oder Trisaccharide, lineare oder verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder

Ferner sind die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) bevorzugt, in denen D Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Polylysin oder Polylysin-Dendrimere oder deren Derivate darstellen.

-saccharidderivate oder für ein Dextran steht.

Die Verknüpfung der Strukturelemente A, D, B, L und W erfolgt entweder direkt oder über übliche funktionelle Gruppen. Solche Gruppen sind beispielsweise Ester, Ether, sekundäre und tertiäre Amine, Amide, Thioharnstoff-, Harnstoff-, Carbamatgruppen oder Maleimidostrukturen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I zur In-vivo-Diagnostik erkrankter Gewebebereiche mittels NIR-Strahlung sowie zur Therapie erkrankter Gewebebereiche.

35 Gegenstand der Erfindung ist ferner ein optisches Diagnostikum zur In-vivo-Diagnostik erkrankter

Gewebebereiche mittels NIR-Strahlung, welches mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthält.

14

- Diese Mittel werden nach den dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt, ggf. unter Verwendung üblicher Hilfs- und/oder Trägerstoffe sowie Verdünnungsmittel und dergleichen. Dazu gehören physiologisch verträgliche Elektrolyte, Puffer, Detergenzien und Substanzen zur
- Anpassung der Osmolarität sowie zur Verbesserung der Stabilität und Löslichkeit. Durch die in der Pharmazie gebräuchlichen Maßnahmen ist für die Sterilität der Zubereitungen bei der Herstellung und insbesondere vor der Applikation zu sorgen.

15
Die Synthese der Farbstoffe

Die Synthese der Farbstoffe F und A erfolgt nach literaturbekannten Methoden, z. B.

- F.M. Hamer in The Cyanine Dyes and Related Compounds,
- John Wiley and Sons, New York, 1964;
 - J. Fabian et al., Chem. Rev. 92 (1992) 1197;
 - L.A. Ernst et al., Cytometrie 10 (1989) 3-10;
 - P.L. Southwick et al., Cytometrie 11 (1990) 418-430;
 - R. B. Mujumdar et al., Bioconjugate Chem. 4 (1993)105-11;
- 25 E. Terpetschnig et al., Anal. Biochem. 217 (1994)197-204;
 - J. S. Lindsey et al., Tetrahedron 45 (1989) 4845-66, EP-0591820 A1;
 - L. Strekowski et al., J. Heterocycl. Chem. 33 (1996) 1685-1688;
- 30 S. R. Mujumdar et al., Bioconjugate Chem. 7 (1996) 356-362;
 - M. Lipowska et al., Synth. Commun. 23 (1993) 3087-94;
 - E. Terpetschnig et al., Anal. Chim. Acta 282 (1993) 633-641;

WO 98/47538 PCT/DE98/01001

M. Matsuoka und T. Kitao, Dyes Pigm. 10 (1988) 13-22 und N. Narayanan und G. Patronay, I. Org. Chem. 60 (1995) 2361-95.

- Die Farbstoffe werden in Anlehnung an literaturbekannte Methoden mit Substituenten synthetisiert, die säurelabile oder enzymatisch spaltbare Bindungen enthalten oder aus denen solche Bindungen nach Kopplung entstehen; z. B. nach
- B. M. Mueller et al., Bioconjugate Chem. 1 (1990) 325-330;
 - K. Srinivasachar und D. M. Neville, Biochemistry 28 (1989) 2501-09;
- D. M. Neville et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 14653-61;
 T. Kaneko et al., Bioconjugate Chem. 2 (1991), 133-41;
 B. A. Froesch et al., Cancer Immunol. Immunother. 42
 (1996), 55-63 und
- J. V. Crivello et al., J. Polymer Sci: Part A: Polymer
 Chem. 34 (1996) 3091-3102.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

Beispiele:

25

1. Synthese von 5-(1-0xoethyl)-1,1'-(4-sulfobutyl)indotricarbocyanin-natriumsalz 1 (Figur 1)

- 4-Hydrazinophenylmethylketon wird aus 4-Aminophenylmethylketon durch Diazotierung und Reduktion mit SnCl₂ synthetisiert (in Anlehnung an T. Górecki et al., J. Heterocyclic Chem. 33 (1996) 1871-76).
 - 4,8 g (32 mmol) 4-Hydrazinophenylmethylketon, 5,4 g Natriumacetat und 3,9 g (45 mmol) 3-Methyl-2-butanon
- werden in 40 ml Essigsäure 1 h bei Raumtemperatur und 4 h bei 120°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird im Vakuum

eingedampft, in 300 ml Dichlormethan aufgenommen und die organische Phase mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach Trocknen über MgSO4 erhält man 7,5 g eines braunen Öls. Dieses wird mit 6,5 g (48 mmol) 1,4-Butansulton 5 h auf 140°C erhitzt, nach dem Abkühlen mit Aceton verrührt und der ausgefallene Feststoff chromatographisch (RP C-18, Laufmittel Methanol/Wasser) gereinigt. Ausbeute: 2,5 g (23%) 5-(1-Oxoethyl)-1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin 2.

16

- Zur Darstellung des Farbstoffes 1 werden 0,5 g (1,7 mmol) 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin 3 mit 0,47 g (1,6 mmol) Glutaconaldehyddianilhydrochlorid in 10 ml Essigsäureanhydrid 30 min bei 120°C gerührt. Nach Abkühlen wird mit 0,6 g (1,8 mmol) 2, 10 ml
- Essigsäureanhydrid, 4 ml Essigsäure und 0,5 g
 Natriumacetat versetzt und 30 min auf 120°c erhitzt. Die
 tiefblaue Lösung wird abgekühlt, mit 200 ml Ether
 verrührt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert.
 Nach chromatographischer Reinigung (RP C-18, Laufmittel
- Methanol/Wasser) und Gefriertrocknung erhält man 0,3 g (26%) Produkt 1.

Elementaranalyse:

5

Ber.: C 61,99 H 6,33 N 3,91 S 8,95

25 Gef.: C 61,73 H 6,49 N 3,80 S 8,78

Absorption: λ_{max} (H₂O) = 748 nm (ϵ = 148000 l mol⁻¹ cm⁻¹)

- 30 2. Modifizierung mit säurelabilen Linkern (Figur 2)
 - 2.1. Umsetzung von 1 mit 4-Carboxyphenylsulfonylhydrazin
- 0,2 g (0,28 mmol) 1 und 74 mg (0,34 mmol) 4-Carboxyphenylsulfonylhydrazin werden in 20 ml Methanol gelöst,
 mit 5 µl Trifluoressigsäure versetzt und 18 h bei Raum-

17

temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum verdampft, der Rückstand mehrfach mit Dichlormethan gewaschen und das Produkt getrocknet. Ausbeute: 0,21 g 4.

5 2.2. Umsetzung von 1 mit 4-Aminobenzoesäurehydrazid

0,2 g (0,28 mmol) 1 und 51 mg (0,34 mmol) 4-Aminobenzoesäurehydrazid werden analog 2.1 umgesetzt. Ausbeute: 0,20 g 5.

10

- 2.3. Umsetzung von 1 mit 4-(Aminomethyl)benzoesäurehydrazid
- 0,2 g (0,28 mmol) 1 und 56 mg (0,34 mmol) 4
 Aminomethylbenzoesäurehydrazid werden analog 2.1

 umgesetzt. Ausbeute: 0,22 g 6.
 - 3. Erzeugung reaktiver funktioneller Gruppen (N-Hydroxysuccinimidester und Isothiocyanat) (Figur 2)

20

25

30

35

Zur Darstellung der entsprechenden N-Hydroxysuccinimidylesterverbindung 7 werden 0,1 g (0,1 mmol) 4 mit 14 mg (0,12 mmol) N-Hydroxysuccinimid (NHS) in 12 ml Dimethylformamid (DMF) vorgelegt und bei Raumtemperatur mit einer Lösung von 23 mg (0,11 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 1 ml DMF versetzt. Nach 72 h Rühren wird das Produkt durch mit Diethylether ausgefällt, abfiltriert und erneut aus DMF/Diethylether umgefällt. Das nach Vakuumtrocknung erhaltene Produkt (12 mg) wird ohne weitere Reinigung verwendet.

Zur Darstellung der säurelabilen Isothiocyanatverbindung 8 werden 0,1 g (0,11 mmol) 5, 33 mg (0,14 mmol) N,N'Thiocarbonyldi-2(1H)-pyridon und 15 mg (0,15 mmol)
Triethylamin in 15 ml Chloroform 60 min. bei
Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wird mit Diethylether

ausgefällt, abfiltriert und mittels HPLC gereinigt (RP Select B, Merck, Laufmittel 10mM Phosphatpuffer pH8 / Methanol). Man erhält 40 mg (40%) 8 nach Gefriertrocknung, Abtrennung der Salze mit Dichlormethan/Methanol und Trocknung im Vakuum.

- 4. Labeling von mAK 9.2.27 (Anti-Melanom-Antikörper)
- 10 4.1. Labeling mit säurelabilem NHS-Ester 7

1 mg Antikörper in 0,5 ml 50mM Boratpuffer (pH 9,2) wird
mit 33 μl 7 (Stammlösung 5 mmol/l in DMF) versetzt und
1 h bei Raumtemperatur gerührt. Ungebundener Farbstoff
wird über NAP-5-Säulen abgetrennt (Elution mit 25 mM
Phosphatpuffer pH 7,8, +0,01% NaN₃). Das Produkt
mAK9.2.27/4-Konjugat wird in Lösung bei 4°C aufbewahrt.

VIS/NIR-Absorptionspektrum von mAK9.2.27/4-Konjugat (in Phophatpuffer pH 7,8) siehe Figur 5.

Fluoreszenzquantenausbeute Q = 0,1 % (5 μ mol/l in Phosphatpuffer pH 7,8; bezogen auf Indocyaningrün als

25

30

Standard mit Q = 13 % in DMSO nach R.C. Benson und H.A. Kues, J. of Chemical and Engineering Data 22 (1977) 379)

5 4.2. Labeling mit säurelabilem Isothiocyanat 8

1 mg Antikörper in 0,5 ml 50mM Boratpuffer (pH 9,2) wird
mit 6 μl 8 (Stammlösung 5 mmol/l in DMF) versetzt und 15
min bei Raumtemperatur gerührt. Ungebundener Farbstoff
vird über NAP-5-Säulen abgetrennt (Elution mit 25 mM
Phosphatpuffer pH 7,4, +0,01% NaN₃). Das Produkt
mAK9.2.27/5-Konjugat wird in Lösung bei 4°C aufbewahrt.

- 5. Synthese von dimeren Indotricarbocyaninfarbstoffen
 - 5.1. Darstellung des symmetrischen Spirodimers 10 (Figur 3)
- 0,1 g (0,47 mmol) 3,9-Diethyliden-2,4,8,10-tetraoxaspiro-[5.5]undecan (nach M. Crivello et al., J. Polymer Sci.: Part A: Polymer Chem. 34 (1996) 3091-3102 synthetisiert) und 0,11 g (0,94 mmol) 6-Amino-1-hexanol werden in 15 ml Diethylether 24 h bei Raumtemperatur gerührt und das
- Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wird an der Ölpumpe getrocknet und ohne weitere Reinigung umgesetzt.
- 0,2 g (0,28 mmol) 5-Carboxy-bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indotricarbocyanin-natriumsalz 9 werden in 15 ml Dichlormethan zusammen mit 0,09 g (0,28 mmol) TBTU und 30 mg
 Triethylamin 30 min gerührt und mit 0,06 g (0,14 mmol)
 o. g. Spiroverbindung in 2 ml Dichlormethan versetzt.
 Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wird das Produkt mit
 Diethylether ausgefällt und chromatographisch gereinigt
- 35 (RP C-18, Laufmittel Methanol/10 mM Phosphatpuffer pH 8).
 Nach Gefriertrocknung werden die Salze mit

Methanol/Dichlormethan ausgefällt. Man erhält 68 mg (26%) Produkt 10.

VIS/NIR-Absorptionspektrum von 10 (5 μ mol/l in Phophatpuffer pH 8) siehe Figur 6.

Fluoreszenzquantenausbeute Q = 0.2 % (5 μ mol/l in Phophatpuffer pH 8; bezogen auf Indocyaningrün als Standard, siehe Beispiel 4.1.).

- 5.2. Darstellung eines Farbstoffdimers (11) mit säurelabilem Hydrazonlinker aus 6 (Figur 4)
- 15 0,1 g (0,14 mmol) 5-Carboxy-bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indotricarbocyanin-natriumsalz 9 werden in 10 ml DMF
 zusammen mit 45 mg (0,14 mmol) TBTU und 15 mg
 Triethylamin 30 min gerührt und mit 0,14 g (0,16 mmol) 6
 in 2 ml DMF versetzt. Nach 5 h Rühren bei Raumtemperatur
 20 wird das Produkt durch Zugabe von Diethylether
 auskristallisiert, abfiltriert und chromatographisch
 gereinigt (RP C-18, Laufmittel Methanol / 10 mM
 Phosphatpuffer pH 8). Nach Gefriertrocknung werden die
 Salze mit Methanol/Dichlormethan ausgefällt. Man erhält
- 25 0,13 g (59%) **11**.

VIS/NIR-Absorptionspektrum von 11 (4 μ mol/l) in Phosphatpuffer pH 8,0 und in Phosphatpuffer pH 6,0 nach 24 h bei 37°C: siehe Figur 7.

5

6. Messung der Fluoreszenzquantenausbeute von 11 bei verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit von der Zeit

Werte bezogen auf Indocyaningrün, siehe Beispiel 4.1.).

Lösungen der Konzentrationen 4 µmol/l in 50 mM

Phosphatpuffer der pH-Werte 7,4; 7,0; 6,6; 6,0 und 5,0

werden bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten

werden Aliquots entnommen und die Fluoreszenzquanten
ausbeuten bestimmt (SPEX Fluorolog Spektralfluorometer,

400 W Xe-Lampe, PM958-Detektor, kalibriert auf

wellenlängenabhängige Empfindlichkeit des Detektors,

20

25

30

Die Beobachtung der Spaltung des säurelabilen Dimers 11 anhand des Anstiegs Fluoreszenzquantenausbeute bei verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit von der Zeit ist in Figur 8 gezeigt.

7. Synthese eines Doxorubicin-Indotricarbocyanin-Konjugates (13) mit säurelabilem Hydrazonlinker (Figur 4)

10

15

20

5

20 mg (34 μmol) Doxorubicin-hydrochlorid und 11 mg (68 μmol) 4-(Aminomethyl)benzoesäurehydrazid werden in 3 ml wasserfreiem Methanol nach Zugabe von 2 μl Trifluoressigsäure 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt 12 wird mit Acetonitril auskristalliert, abzentrifugiert, mit Acetonitril gewaschen und getrocknet, Ausbeute 18 mg (24 μmol) Rohprodukt. 14 mg (20 μmol) 5-Carboxy-bis-1,1'-(4-sulfobutyl)-indotricarbocyanin-natriumsalz 9 werden in 0,5 ml DMF zusammen mit 7 mg (22 μmol) TBTU und 20 μl Triethylamin 30 min gerührt. Dieses Reaktionsgemisch wird tropfenweise bei 0°C zu einer Lösung von o. g. 12 (18 mg in 0,2 ml DMF) gegeben und 3 h bei 0°C gerührt. Das Produkt wird durch Zugabe von Diethylether ausgefällt und analog

Beispiel 5 chromatographisch gereinigt. Man erhält 12 mg (47%) 13.

23

WO 98/47538 PCT/DE98/01001

Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel I

5

25

 $(F-L)_m-A$ (I)

worin

- 10 F für ein Farbstoffmolekül mit mindestens einem Absorptionsmaximum zwischen 600 und 1200 nm steht,
- L für eine Linkerstruktur, welche eine säurelabile und/oder enzymatisch spaltbare Bindung enthält, steht,
 - m eine Zahl zwischen 1 und 80 ist,
- wobei für den Fall, daß m eine Zahl zwischen 1 und 3 ist,
 - A ein Farbstoffmolekül mit mindestens einem
 Absorptionsmaximum zwischen 600 und 1200 nm, ein
 antibiotisch oder antizytostatisch wirksames
 Molekül, ein Biomolekül, ein nicht biologisches
 Makromolekül oder eine Verbindung B-(L-W), oder
 D-(L-W), darstellt, wobei
- 30 D ein nicht biologisches Makromolekül ist,
 - B ein Biomolekül ist,
 - L die oben genannte Bedeutung hat,
 - W ein antibiotisch oder antizytostatisch wirksames Molekül darstellt,
- o eine Zahl zwischen 1 und 20 ist,

und wobei für den Fall, daß m eine Zahl zwischen 4 und 80 ist,

A ein Biomolekül, ein nicht biologisches

Makromolekül oder eine Verbindung B-(L-W), oder

D-(L-W), darstellt, wobei

D, B, L, W und o die oben genannten Bedeutungen haben.

10

15

20

5

- Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in den allgemeinen Formeln (I) F und/oder A für einen Polymethinfarbstoff, Tetrapyrrolfarbstoff, Tetraazapyrrolfarbstoff, Xanthinfarbstoff, Phenoxazinfarbstoff oder Phenothiazinfarbstoff stehen.
- 3. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) F und/oder A für einen Cyanin-, Squarilium-, Croconium-, Merocyanin- oder Oxonolfarbstoff stehen.
- 4. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden
 25 Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der
 allgemeinen Formel (I) F und/oder A für einen
 Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel (II)

$$R^{2}$$
 R^{3}
 R^{4}
 $CH=Q-CH=$
 R^{6}
 R^{6}
 R^{1}
 R^{7}
 R^{8}
 R^{9}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{2}
 R^{3}
 R^{4}
 $CH_{2}R^{5}$
 R^{6}
 R^{6}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{2}
 R^{3}
 R^{4}
 CH_{2}
 R^{5}
 R^{6}
 R^{6}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{2}
 R^{3}
 R^{4}
 R^{1}
 R^{2}
 R^{3}
 R^{4}
 R^{4}
 R^{5}
 R^{6}
 R^{6}
 R^{6}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{1}
 R^{2}
 R^{3}
 R^{4}
 R^{5}
 R^{5}
 R^{6}
 R^{5}
 R^{5}
 R^{5}

30

stehen,

26

worin

5

10

15

20

25

30

 R^1 bis R^4 und R^7 bis R^{10} unabhängig voneinander für ein Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatom oder eine Nitrogruppe oder für einen Rest -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹, -E¹,

wobei E¹ und E² unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C₁-C₅₀-Alkylkette, wobei die Kette oder Teile dieser Kette gegenbenenfalls eine oder mehrere aromatische oder gesättigte zyklische C₅-C₆- oder bizyklische C₁₀-Einheiten formen können, steht, und wobei die C₁-C₅₀-Alkylkette von 0 bis 15 Sauerstoffatomen und/oder von 0 bis 3 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen, 0 bis 5 Estergruppen, 0 bis 3 Carboxygruppen bzw. 0 bis 3 Aminogruppen substituiert ist,

und wobei jeweils benachbarte Reste R_1 - R_4 und/oder R_7 - R_{10} unter Bildung eines sechsgliedrigen aromatischen Kohlenstoffringes miteinander verknüpft sein können,

R⁵ und R⁶ unabhängig voneinander für einen Rest -E¹ mit der oben angegebenen Bedeutung oder für eine C₁-C₄-Sulfoalkylkette stehen, und/oder R¹ bis R¹⁰ für eine Verknüpfung mit L stehen,

Q ein Fragment

PCT/DE98/01001

$$= CH^{11} \qquad = CH$$

ist,
worin

R¹¹ für ein Wasserstoff-, Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatom oder eine Nitrogruppe oder einen Rest $-NE^1E^2$, $-OE^1$ oder $-E^1$, wobei E^1 und E^2 die oben angegebene Bedeutung haben oder für eine Verknüpfung mit L steht,

 ${
m R}^{12}$ für ein Wasserstoffatom oder einen Rest ${
m E}^1$ mit der oben angegebenen Bedeutung steht,

b eine Zahl 0, 2 oder 3 bedeutet,

15

25

10

5

X und Y unabhängig voneinander Reste O, S, -CH=CH-oder ein Fragment

20 darstellen,

worin

 R^{13} und R^{14} unabhängig voneinander für Wasserstoff, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C_1 - C_{10} -Alkylkette, die durch bis zu 5 Sauerstoffatome unterbrochen und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann, stehen, und wobei die Reste R^{13} und

28

R14 unter Ausbildung eines 5- oder 6-gliedrigen Ringes miteinander verknüpft sein können.

- 5. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden 5 Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) W oder A für Antibiotika, Folsäure-Analoga, Pyrimidin-Analoga, Purin-Analoga, hormonell wirksame Substanzen sowie weitere cytostatisch wirksame Substanzen stehen. 10
 - 6. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) L für eine Struktur steht, welche ein säurelabiles Fragment

20 worin p für eine Zahl zwischen 2 und 4 steht, enthält.

7. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der 25 allgemeinen Formel (I) L für eine Struktur steht,

35

WO 98/47538 PCT/DE98/01001

welche eine enzymatisch spaltbare chemische Bindung enthält.

- 8. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) L für eine Struktur steht, die durch Kathepsine, Peptidasen, Carboxypeptidasen, α-und β-Glykosidasen, Lipasen, Phospholipasen, Phosphatasen, Phosphodiesterasen, Proteasen, Elastasen, Sulfatasen, Reduktasen und bakterielle Enzyme gespalten wird.
- 9. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) 15 A und/oder B für einen Antikörper, deren Konjugate und Fragmente, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, natürliche oder synthetische Ribonukleinsäuren oder Desoxyribonukleinsäuren oder deren chemische 20 Modifikationen, wie Aptamere oder Antisenseoligonukleotide, Lipoproteine, Lectine, Kohlenhydrate, Mono-, Di- oder Trisaccharide, lineare oder verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder -saccharidderivate oder für ein Dextran steht. 25
 - 10. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) D für Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Polylysin oder Polylysin-Dendrimere oder deren Derivate steht.
 - 11. Verwendung von Verbindungen nach Anspruch 1 zur Invivo-Diagnostik erkrankter Gewebebereiche mittels
 NIR-Strahlung sowie zur Therapie erkrankter
 Gewebebereiche.

5

30

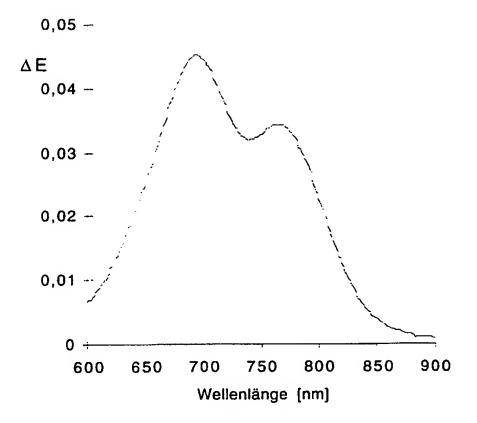
12. Optisches Diagnostikum zur In-vivo-Diagnostik erkrankter Gewebebereiche mittels NIR-Strahlung, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine Verbindung nach Anspruch 1 zusammen mit den üblichen Hilfsund /oder Trägerstoffen sowie Verdünnungsmitteln enthält.

ERSATZBLATT (REGEL 26)

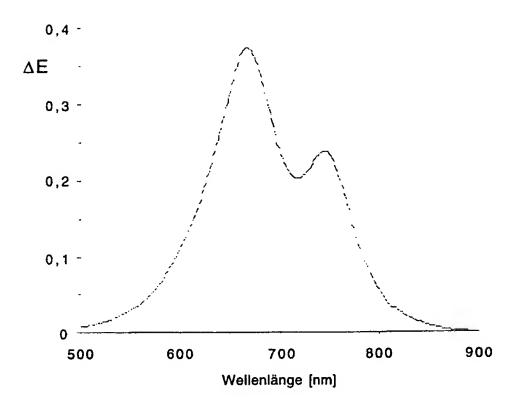
ERSATZBLATT (REGEL 26)

ERSATZBLATT (REGEL 26)

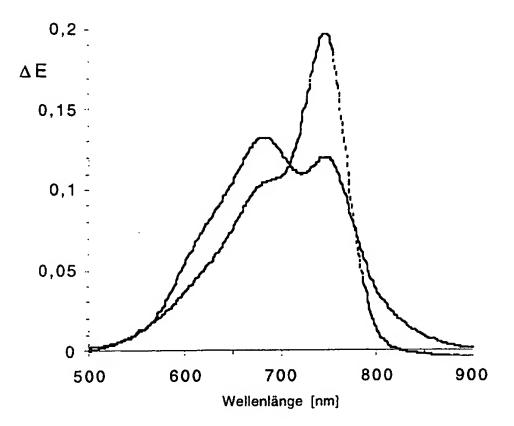
ERSATZBLATT (REGEL 26)

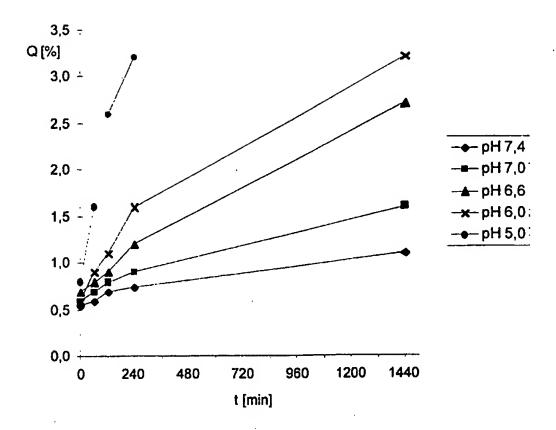


Figur 5 VIS/NIR-Absorptionspektrum von mAK9.2.27 / 4-Konjugat (siehe Beispiel 4.1) in Phophatpuffer pH 7,8



Figur 6 VIS/NIR-Absorptionspektrum 10 (siehe Beispiel 5.1), 5 µmol/l in Phophatpuffer pH 8





Figur 8 Beobachtung der Spaltung des säurelabilen Dimers 11 anhand des Anstiegs Fluoreszenzquantenausbeute bei verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit von der Zeit (siehe Beispiel 6).

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 98/47538

A61K 41/00, 49/00

DE

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

29. Oktober 1998 (29.10.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE98/01001

(22) Internationales Anmeldedatum:

2. April 1998 (02.04.98)

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

197 17 904.5

23. April 1997 (23.04.97)

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTI-TUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer

Damm 130, D-14050 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LICHA, Kai [DE/DE]; Argentinische Allee 179, D-14169 Berlin (DE). RIEFKE, Björn [DE/DE]; Weverstrasse 51, D-13595 Berlin (DE). SEMMLER, Wolfhard [DE/DE]; Jahnstrasse 17, D-13467 Berlin (DE). WRASIDLO, Wolfgang [DE/DE]; Knausstrasse 14, D-14193 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe-21. Januar 1999 (21.01.99)

(54) Title: ACID-LABILE AND ENZYMATICALLY DIVISIBLE DYE COMPOUNDS FOR DIAGNOSIS WITH NEAR INFRARED LIGHT AND FOR THERAPY

(54) Bezeichnung: SÄURELABILE UND ENZYMATISCH SPALTBARE FARBSTOFFKONSTRUKTE ZUR DIAGNOSTIK MIT NAHINFRAROTLICHT UND ZUR THERAPIE

(57) Abstract

The invention relates to acid-labile and enzymatically divisible compounds for in-vivo and in-vitro diagnosis by means of near infrared radiation (NIR-radiation), the use of said compounds as optic diagnostic and therapeutic agents, and the diagnostic agents containing said compounds.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft säurelabile und enzymatisch spaltbare Verbindungen zur In-vivo- und In-vitro-Diagnostik mittels Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung), die Verwendung dieser Verbindungen als optische Diagnostika und Therapeutika und diese Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland .	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
СН	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
СМ	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		
					- •		

Internatio Application No
PCT/DE 98/01001

A. CLASSI IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER A61K41/00 A61K49/00		-
			!
According to	International Patent Classification (IPC) or to both national classification	tion and IPC	
	SEARCHED		
Minimum do IPC 6	cumentation searched (classification system followed by classification A61K	n symbols)	
Documental	tion searched other than minimum documentation to the extent that su	ch documents are included in the fields sea	arched
		·	
Electronic d	ata base consulted during the international search (name of data bas	se and, where practical search terms used	
			•
• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •			
C. DOCUMI	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Citation of document, with indication, where appropriate, of the rele	vant nassance	Rolawant to plains \$15
	onacon or occurrent, with indication, where appropriate, of the reie	van hassades	Relevant to claim No.
Y	EP 0 476 408 A (BRUNSWICK CORP) 25 March 1992		1-12
	see column 3, line 30-50		
	see column 4, line 35 - line 49-5 3,6,9,12	l; claims	
χ	WO 96 17628 A (DIAGNOSTIKFORSCHUN	IG INST	1-12
	;LICHA KAI (DE); RIEFKE BJOERN (D 13 June 1996	E); SEMM)	
	see abstract		
Y	see page 26; claim 5		1-12
Υ	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN		1-12
	vol. 095, no. 009, 31 October 199	5	
	& JP 07 145148 A (BIO SENSOR KENKYUSHO:KK), 6 June 1995		
	see abstract; figures 2-5		
		·/	
		·	
X Furt	her documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members are listed in	in annex.
1		"T" later document published after the inter	rnational filing date
consid	ent defining the general state of the art which is not dered to be of particular relevance	or priority date and not in conflict with cited to understand the principle or the invention	eory underlying the
fiting o	and and	"X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot	claimed invention the considered to
which	ent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another nor other special reason (as specified)	involve an inventive step when the do "Y" document of particular relevance; the o	cument is taken alone claimed invention
"O" docum	ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means	cannot be considered to involve an in document is combined with one or mo	ventive step when the ore other such docu-
"P" docume	ent published prior to the international filing date but han the priority date daimed	ments, such combination being obvious in the art. "&" document member of the same patent	
	actual completion of theinternational search	Date of mailing of the international sea	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
9	October 1998	22/10/1998	
Name and	mailing address of the ISA	Authorized officer	
	European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk		
	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni, Fax: (+31-70) 340-3016	Gonzalez Ramon, N	

4

Internation pplication No
PCT/DE 98/01001

 \mathcal{J}^{*}

	PCT/DE 98/01001			
ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	• •			
Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.			
EP 0 175 617 A (CYTOGEN CORP) 26 March 1986 see page 38 see page 45-47; claims 2,7,10,16,35,39; example 11	1-12			
WD 98 22146 A (LICHA KAI ;RIEFKE BJOERN (DE); DYRKS THOMAS (DE); TURNER JONATHAN) 28 May 1998 see page 14-15; claim 10 see abstract	1-12			
WO 97 13490 A (LICHA KAI ;RIEFKE BJOERN (DE); HELDMANN DIETER (DE); DIAGNOSTIKFOR) 17 April 1997 see page 7-9; claims 5-8,10,11	1-12			
LICHA, KAI ET AL: "Synthesis and characterization of cyanine dye - poly(ethylene glycol) conjugates as contrast agents for in vivo fluorescence imaging" PROC. SPIE-INT. SOC. OPT. ENG., 1998, 3196, 98-102, XP002079471 see abstract; figure 2	1-12			
EP 0 800 831 A (DAIICHI PURE CHEMICALS CO LTD) 15 October 1997 see page 3-5 see page 7, line 20-24 see page 8, line 20-30; claims 4,18,20,23	1-5,9-12			
LICHA, K. ET AL: "Synthesis and characterization of cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging" PROC. SPIE-INT. SOC. OPT. ENG., 1996, 2927, 192-198, XP002079648 see abstract; figure 3	1-12			
	EP 0 175 617 A (CYTOGEN CORP) 26 March 1986 see page 38 see page 45-47; claims 2,7,10,16,35,39; example 11 WO 98 22146 A (LICHA KAI ;RIEFKE BJOERN (DE); DYRKS THOMAS (DE); TURNER JONATHAN) 28 May 1998 see page 14-15; claim 10 see abstract WO 97 13490 A (LICHA KAI ;RIEFKE BJOERN (DE); HELDMANN DIETER (DE); DIAGNOSTIKFOR) 17 April 1997 see page 7-9; claims 5-8,10,11 LICHA, KAI ET AL: "Synthesis and characterization of cyanine dye - poly(ethylene glycol) conjugates as contrast agents for in vivo fluorescence imaging" PROC. SPIE-INT. SOC. OPT. ENG., 1998, 3196, 98-102, XP002079471 see abstract; figure 2 EP 0 800 831 A (DAIICHI PURE CHEMICALS CO LTD) 15 October 1997 see page 3-5 see page 7, line 20-24 see page 8, line 20-30; claims 4,18,20,23 LICHA, K. ET AL: "Synthesis and characterization of cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging" PROC. SPIE-INT. SOC. OPT. ENG., 1996, 2927, 192-198, XP002079648			

International application No.

PCT/DE 98/01001

Box I	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)
This inte	rnational search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1. X	Claims Nos.: 11 & 12 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
	Observation: Although the Claim(s) relate(s) to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2.	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Вох П	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)
This Inte	ernational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
· 🗀	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.

Information on patent family members

Internation pplication No
PCT/DE 98/01001

		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		FCI/UE	39/01001	
	atent document d in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP	0476408	A	25-03-1992	CA JP	2048089 A 5238951 A	18-03-1992 17-09-1993
WO	9617628	Α	13-06-1996	DE	4445065 A	13-06-1996
				AU	3740995 A	26-06-1996
				CA	2205906 A	13-06-1996
				CN Ep	1174511 A 0796111 A	25-02-1998 24-09-1997
				HU	0796111 A 77378 A	28-04-1998
				NO	972509 A	02-06-1997
				ZA	9509707 A	29-05-1996
	~		,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,			29-05-1990
EP	0175617	Α	26-03-1986	US	4867973 A	19-09-1989
				AU	3016189 A	13-07-1989
				AU	583854 B	11-05-1989
			•	AU	4807185 A	08-04-1986
				CA	1326834 A	08-02-1994
				DE	3584559 A	05-12-1991
				DK	218386 A	11-07-1986
				JP	62500175 T	22-01-1987
				US	4950738 A	21-08-1990
				WO	8601720 A	27-03-1986
				US	5162512 A	10-11-1992
				US	5156840 A	20-10-1992
				US	5140104 A	18-08-1992
WO	9822146	Α	28-05-1998	DE	19649971 A	28-05-1998
				AU	7298598 A	10-06-1998
WU	9713490	Α	17-04-1997	DE	19539409 A	17-04-1997
	•			AU	1589297 A	30-04-1997
				EP	0854732 A	29-07-1998
				NO 	981586 A	07-04-1998
EP	0800831	Α	15-10-1997	AU	4497096 A	21-08-1996
				NO	973484 A	30-09-1997
				CA	2211470 A	08-08-1996
	**			JP	9127115 A	16-05-1997
				WO	9623525 A	08-08-1996

Internatio 3 Aktenzeichen PCT/DE 98/01001

IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES A61K41/00 A61K49/00		•
Nach der In	ternationalen Patentidassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klass	sifikation und deriPK	
	RCHIERTE GEBIETE		
Recherchier IPK 6	ter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbol A61K	le)	
	te aber nicht zum Mindestprüfstoffgehörende Veröffentlichungen, sov	•	
	r internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Na	ame der Datenbank und evtl. verwendete S	Suchbegriffe)
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 476 408 A (BRUNSWICK CORP) 25. März 1992 siehe Spalte 3, Zeile 30-50		1-12
	siehe Sparte 3, Zeile 30-50 siehe Spalte 4, Zeile 35 - Zeile Ansprüche 3,6,9,12	49-51;	
X	WO 96 17628 A (DIAGNOSTIKFORSCHUN ;LICHA KAI (DE); RIEFKE BJOERN (D 13. Juni 1996		1-12
Υ	siehe Zusammenfassung siehe Seite 26; Anspruch 5		
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 095, no. 009, 31. Oktober 19 & JP 07 145148 A (BIO SENSOR KENKYUSHO:KK), 6. Juni 1995 siehe Zusammenfassung; Abbildunge		1-12
		/	
		,	
	tere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie	
"A" Veröffe aber n "E" älteres Anmel "L" Veröffe scheir	ntlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen idedatum veröffentlicht worden ist ntlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- nen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht Anmeldung nicht kollidiert, sondern nui Erlindung zugrundellegenden Prinzips Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedei kann allein aufgrund dieser Veröffentlicher Tätigkeit beruhend betre	worden ist und mit der zum Verständnis des der oder der ihr zugrundeliegenden utung; die beanspruchte Erfindung chung nicht als neu oder auf achtet werden
soll od ausge "O" Veröffe eine 8 "P" Veröffe	der die aus einemanderen besonderen Grund angegeben ist (wie führt) oblichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht offlichung, die vor dem internationalen Apmeldedetum, aber nach	"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedec kann nicht als auf erfinderischer Tätigk werden, wenn die Veröffentlichung mit Veröffentlichungen dieser Kategorie in diese Verbindung für einen Fachmann "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselber	eit beruhend betrachtet einer oder mehreren anderen Verbindung gebracht wird und naheliegend ist
	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Re	cherchenberichts
9	. Oktober 1998	22/10/1998	
Name und (Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2	Bevollmächtigter Bediensteter	
	NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Gonzalez Ramon, N	

Internation ; Aktenzeichen
PCT/DE 98/01001

		PCT/DE 98/01001
C.(Fortsetz	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommend	den Teile Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 175 617 A (CYTOGEN CORP) 26. März 1986 siehe Seite 38 siehe Seite 45-47; Ansprüche 2,7,10,16,35,39; Beispiel 11	1-12
E	WO 98 22146 A (LICHA KAI ;RIEFKE BJOERN (DE); DYRKS THOMAS (DE); TURNER JONATHAN) 28. Mai 1998 siehe Seite 14-15; Anspruch 10 siehe Zusammenfassung	1-12
X	WO 97 13490 A (LICHA KAI ;RIEFKE BJOERN (DE); HELDMANN DIETER (DE); DIAGNOSTIKFOR) 17. April 1997 siehe Seite 7-9; Ansprüche 5-8,10,11	1-12
X	LICHA, KAI ET AL: "Synthesis and characterization of cyanine dye - poly(ethylene glycol) conjugates as contrast agents for in vivo fluorescence imaging" PROC. SPIE-INT. SOC. OPT. ENG., 1998, 3196, 98-102, XP002079471 siehe Zusammenfassung; Abbildung 2	1-12
X,P	EP 0 800 831 A (DAIICHI PURE CHEMICALS CO LTD) 15. Oktober 1997 siehe Seite 3-5 siehe Seite 7, Zeile 20-24 siehe Seite 8, Zeile 20-30; Ansprüche 4,18,20,23	1-5,9-12
X	LICHA, K. ET AL: "Synthesis and characterization of cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging" PROC. SPIE-INT. SOC. OPT. ENG., 1996, 2927, 192-198, XP002079648 siehe Zusammenfassung; Abbildung 3	1-12

Interna Lnales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01001

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt
Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:
1. X Ansprüche Nr. 11 & 12 weil Sie sich auf Gegenstande beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen K rpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich
auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
·
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)
Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:
Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erfordertichen zusätzlichen Recherchengebuhren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwahnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Angaben zu Veröffentlichungen, aus zur selben Patentfamilie gehören

Internation. Aktenzeichen
PCT/DE 98/01001

lm Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der - Veröffentlichung	
EP	0476408	Α	25-03-1992	CA	2048089 A	18-03-1992
4.			·	JP	5238951 A	17-09-1993
WO	9617628	Α	13-06-1996	DE	4445065 A	13-06-1996
				AU	3740995 A	26-06-1996
				CA	2205906 A	13-06-1996
				CN	1174511 A	25-02-1998
				EP	0796111 A	24-09-1997
				HU	77378 A	28-04-1998
				NO	972509 A	02-06-1997
				ZA 	9509707 A	29-05-1996
EP	0175617	Α	26-03-1986	US	4867973 A	19-09-1989
				AU	3016189 A	13-07-1989
				AU	583854 B	11-05-1989
				AU	4807185 A	08-04-1986
				CA	1326834 A	08-02-1994
				DE	3584559 A	05-12-1991
				DK	218386 A	11-07-1986
			•	JP	.62500175 T	22-01-1987
				US	4950738 A	21-08-1990
				WO	8601720 A	27-03-1986
				US	5162512 A	10-11-1992
				US	5156840 A	20-10-1992
	~			US	5140104 A	18-08-1992
WO	9822146	Α	28-05-1998	DE	19649971 A	28-05-1998
				AU	7298598 A	10-06-1998
WO	9713490	Α	17-04-1997	DE	19539409 A	17-04-1997
				AU	1589297 A	30-04-1997
				EP	0854732 A	29-07-1998
				NO 	981586 A	07-04-1998
EP	0800831	Α	15-10-1997	AU	4497096 A	21-08-1996
				NO	973484 A	30-09-1997
				CA	2211470 A	08-08-1996
				JP	9127115 A	16-05-1997
				WO	9623525 A	08-08-1996